

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

B6

TRANSLATION

JAPANESE PATENT OFFICE

(Laid Open) PATENT REPORT (A)

(11) (Laid Open) Patent Application KOKAI No. Hei 6-293631
(43) Date of Publication: October 21, 1994
Number of Claims: 6

(Total 6 pages)

(51) Int. Cl. ³	ID.No.	Internal Filing Codes
A 61 K	9/00	F 7329-4C
	47/42	B 7433-4C

(21) Patent Application No.: Hei 5-80939

(22) Date of Application: April 7, 1993

Requested for an application of the Patent Act Section 30 Paragraph 1. October 27, 1992.
Published in "October 27, Heisei 4 (1992) Nippon Pharmacology Society Kyushu Regional
Conference Abstract" issued by Japan Pharmacology Society Kyushu Region.

(71) Applicant: Yuuki Odagiri
1675-32 Nagamine-machi, Kumamoto-shi, Kumamoto-ken

(72) Inventor: Yuuki Odagiri
1675-32 Nagamine-machi, Kumamoto-shi, Kumamoto-ken

(72) Inventor: Teruko Imai
24-26 Hanadachi 2-chome, Kumamoto-shi, Kumamoto-ken

(72) Inventor: Yoshitaka Nishida
5-7 Ikaruga Okitome 9-chome, Ikoma-gun, Nara-ken

(72) Inventor: Kenji Kida
5-22 Obiyama 2-chome, Kumamoto-shi, Kumamoto-ken

(74) Agent: Shusaku Yamamoto, Patent Agent

(54) Title of the Invention: DRUG DELIVERY SYSTEM USING A KERATIN
HYDROLYSIS PRODUCT AS A CARRIER

(57) [Abstract]

5 [Objective]

To propose an inexpensive and low toxicity drug delivery system using a keratin hydrolysis product as a carrier.

10 [Constitution]

A keratin hydrolysis product is a peptide obtained upon hydrolyzing keratin, a protein found in living organisms, and has a long residence time in blood. The optimum effective level of a pharmaceutical drug is sustained over an extended period of time when a drug delivery system of this invention in which a pharmaceutical drug is administered upon binding it on a keratin hydrolysis product carrier is utilized. The keratin hydrolysis product moves differently *in vivo* depending upon administration route and accumulates in specific areas. Therefore, a keratin hydrolysis product can be bonded with a pharmaceutical drug designed to realize drug efficacy in a specific area and administered to allow the pharmaceutical drug to accumulate in the specific area and enhance efficacy of the pharmaceutical drug.

20 [Scope of the Patent Claim]

[Claim 1]

A drug delivery system used to administer a pharmaceutical drug supported on a carrier in which said carrier contains a keratin hydrolysis product.

[Claim 2]

The drug delivery system described in claim (1) in which molecular weight of the aforementioned keratin hydrolysis product is 3,500 to 4,500.

30 [Claim 3]

The drug delivery system described in claim (1) or (2) in which the aforementioned pharmaceutical drug is directed toward liver or kidney.

[Claim 4]

The drug delivery system described in claim (1) or (2) in which the aforementioned pharmaceutical drug is a peptide formulation.

5 **[Claim 5]**

The drug delivery system described in claim (1) or (2) in which the aforementioned pharmaceutical drug is selected from a group comprising anti-inflammatory agents, anti-cancer agents, and anti-viral agents.

10 **[Claim 6]**

The drug delivery system described in any one of claim (1) through (5) in which [the aforementioned pharmaceutical drug] is a controlled-release formulation.

[Detailed Description of the Invention]

15 **[0001]**

[Field of Industrial Utility]

This invention deals with a drug delivery system that uses a keratin hydrolysis product as a carrier. More specifically, this invention deals with a drug delivery system using a keratin hydrolysis product as a carrier in order to present a formulation that has a relatively long half life
20 in blood and enables effective distribution of a pharmaceutical drug active ingredient in target tissues.

[0002]

[Prior Art]

25 A pharmaceutical drug is administered in a designated form such as tablets and injections. However, the entire pharmaceutical drug introduced into a human body is not involved in achieving effective results. Only a fraction of the pharmaceutical drug reaches target organs and helps to realize the drug efficacy. The remainder of the pharmaceutical drug reaches other internal organs where the pharmaceutical drug is not needed and causes side effects. The
30 conventional formulations were used as convenient means to transport pharmaceutical drugs to sites where action was needed, and some waste, inefficiencies, and undesired effects were accepted as unavoidable nuisance. Drug delivery systems were developed to solve these problems and are systems designed to transfer pharmaceutical drugs to target areas or near there without affecting other organs. These systems are used to eliminate accumulation of

unnecessarily high drug concentration in blood, to extent the duration of time optimum level is sustained in a human body, and to suppress appearance of side effects.

[0003]

- 5 A drug delivery system needs to have a targeting function and a controlled release function. The targeting function enables a system to transfer a pharmaceutical drug to a target (specific cells, tissues or organs) in a human body and selectively adsorb, accumulate and act. The controlled release function prevents said pharmaceutical drug from being released and metabolized in a short span of time and enables a constant concentration to be maintained.

10

[0004]

- Polymer films such as those of ethylene-vinyl acetate copolymers, poly(lactic acid), poly(ethylene glycol), and styrene maleic acid copolymers are useful in controlling the release of pharmaceutical products. In addition, research programs are continuing to develop bio
- 15 medicines that use gradual release polymers that decompose *in vivo* and to formulate gradual release pharmaceutical products using collagen. However, problems related to *in vivo* compatibility, toxicity or cost were encountered.

[0005]

- 20 As far as the targeting function of drug delivery systems is concerned, the most direct targeting function places a drug delivery system in an affected tissue *in vivo*. This type of system is already in use in gynecology and ophthalmology. For example, a gynecological system was developed to prevent conception by inserting progesterone placed in a T shaped pouch into uterus. In ophthalmology, a clear, controlling film was used to seal pirocalpin [transliteration]
- 25 and implant the pouch in the fundus of an eye in glaucoma patients in the manner contact lenses are.

[0006]

- However, additional research is needed to improve targeting function *in vivo*, and the success is
- 30 largely dependent on carrier selection. For example, an inexpensive and low toxicity carrier that is uniquely incorporated into either liver or kidney has not been discovered yet. Therefore, a carrier that bonds with a pharmaceutical drug that needs to deliver its efficacy to the liver or kidney and allows the pharmaceutical drug to sustain effective concentration in the liver or kidney without having side effects on other organs needs to be developed. Furthermore,

adsorption on mucous membrane is poor and half-life in blood is short due to the fact that a human body identifies it as a foreign material when a pharmaceutical drug is a protein formulation. Therefore, carriers having a capability to extend the residence time in blood of protein formulations need to be developed.

5

[0007]

[Problems for the Invention to Solve]

This invention solves the problems mentioned above. The objective is to present a carrier for a low toxicity, inexpensive drug delivery system. More specifically, the objective is to present a carrier that directs a pharmaceutical drug to specific locations such as liver and kidney and also imparts long residence time in blood. Another objective is to establish a drug delivery system using such a carrier.

10

[0008]

15 **[Means to Solve the Problems]**

This invention deals with a drug delivery system that administers a pharmaceutical drug supported on a carrier containing a keratin hydrolysis product, and this invention achieves the objectives mentioned above through this system.

20

[0009]

In a preferred execution mode, molecular weight of said keratin hydrolysis product is between 3,500 and 4,500.

[0010]

25 In one execution mode of this invention, said drug delivery system directs a pharmaceutical drug to liver or kidney.

[0011]

In one execution mode of this invention, the pharmaceutical drug used in a drug delivery system of this invention is a peptide formulation.

30

[0012]

In another execution mode of this invention, the pharmaceutical drug used in a drug delivery system of this invention is selected from a group comprising anti-inflammatory agents, anti-cancer agents, and anti-viral agents.

5

[0013]

In another execution mode of this invention, said drug delivery system is a controlled-release formulation.

10 [0014]

In this invention, "a carrier" refers to a substance that is mixed and dispersed along with a pharmaceutical drug and is bound to the pharmaceutical drug through means such as adsorption and chemical bonding to form a complex.

15 [0015]

"A controlled-release formulation" refers to a formulation that gradually discharges (releases) a pharmaceutical drug at a desired rate over a designated period of time when the pharmaceutical drug-carrier complex described above is administered *in vivo*.

20 [0016]

"Keratin" refers to a major protein ingredient in a structural material on the outermost surface of a human body derived from epidermis of an animal skin. It is an insoluble inter-cellular protein rich in disulfide bonds.

25 [0017]

"A keratin hydrolysis product" refers to a substance obtained by hydrolyzing the keratin described above and is a water-soluble substance.

[0018]

30 Keratin raw material can be obtained inexpensively and in large quantities from bovine hoofs, sheep wool, feathers, hair and nails. As the hydrolysis method, a hydrolysis using Na_2S , hydrolysis using an enzyme, hydrolysis using an acid, and hydrolysis using an alkali can be mentioned. However, a hydrolysis using Na_2S is preferred. A keratin hydrolysis product can be readily prepared by conducting a one-step hydrolysis of a raw material. A keratin hydrolysis

product having a desired molecular weight can be isolated from a keratin hydrolysis solution containing keratin hydrolysis products having various molecular weights using gel filtration or dialysis membrane separation.

5 [0019]

In a drug delivery system of this invention using keratin as a carrier, a pharmaceutical drug-keratin hydrolysis product complex can be obtained by bonding a pharmaceutical drug and a keratin hydrolysis product using a method such as chemical bonding, physical adsorption, and ionic bonding well known to the practitioners. In an ideal execution mode, a chemical bond is
10 formed through a chemical treatment upon dissolving a pharmaceutical drug in an aqueous solution containing a keratin hydrolysis product.

[0020]

The quantitative relationship between keratin and a pharmaceutical drug in the pharmaceutical
15 drug-keratin hydrolysis product complex described above is between 20 parts and 100 parts of the pharmaceutical product or preferably between 40 parts and 50 parts to 100 parts by weight of the keratin hydrolysis product. The keratin hydrolysis product concentration when a solution is used is 0.1-10% by weight, and 0.5-1.0% by weight is preferred.

20 [0021]

The pharmaceutical product-keratin complex described above is converted into an injection formulation by dissolving it in a physiological saline solution, a physiological buffer solution, or distilled water for injections, adjusting the pH to 7.0-7.4, and sterilizing it. Distilled water for injections is preferred. The formulation prepared is administered intravenously, subcutaneously,
25 or intra-muscularly. It can also be administered through a mucous membrane in the form of capsules, tablets, or a solution.

[0022]

The keratin hydrolysis product used as the carrier enables a long residence time in blood in a
30 drug delivery system of this invention.

[0023]

A keratin hydrolysis product administered to a human body is hydrolyzed by a protease *in vivo* and excreted in urine. The excretion rate is much slower than that of other proteins, and the

residence time in blood is long. The bonding ratios when a solution having a designated concentration of a keratin hydrolysis product (referred to as keratin 4000) was brought in contact with murine plasma or human serum albumin (HAS) are shown in Table 1. The keratin hydrolysis product used had a molecular weight of about 4,000 and was obtained by hydrolyzing water buffalo hooves using Na₂S. As indicated by the results, keratin hydrolysis products bonded strongly with plasma components. An extended residence time in blood is attributed to this characteristic.

[0024]

[Table 1]

Keratin 4000	Mouse plasma	4% HAS
0.0004%	85.5±0.6	69.5±1.8
0.00112%	91.5±1.9	71.8±3.2
0.002%	92.2±4.5	72.5±2.2

[0025]

Therefore, the residence time in blood of a pharmaceutical drug-keratin complex can be enhanced and drug efficacy can be magnified by bonding [the carrier] to a protein formulation pharmaceutical drug having a short digestive half life such as super oxide damastase [transliteration] (SOD) as shown in the examples. An interdependent relationship exists between a molecular weight of keratin hydrolysis products and disappearance rate from individual organs, and it is thought that disappearance from an organ can be adjusted using the molecular weight of keratin hydrolysis products.

[0026]

When a residence time in blood of a polymeric compound is extended, the compound is generally known to increase the tendency to migrate to a tissue where blood vessel permeability is enhanced as in inflamed sections. Taking advantage of this phenomenon, a pharmaceutical drug can be transferred efficiently to an inflamed area where drug efficacy is desired by using a keratin hydrolysis product as a carrier and by bonding it with a pharmaceutical drug agent such as an anti-inflammatory agent, an anti-cancer agent, or an anti-viral agent and administering it intravenously, intramuscularly, or subcutaneously.

[0027]

A high proportion of keratin hydrolysis products is distributed to liver and kidney when intravenously administered, and the keratin disappearing from the blood is uniquely accumulated in liver and kidney. This characteristic enables a pharmaceutical drug with preferred site of drug efficacy achievement in liver or kidney to be directed to those sites.

[0028]

Furthermore, this approach is effective even when the pharmaceutical drug is peptide and the drug efficacy disappears upon hydrolysis caused by protease. That is, when peptide is the pharmaceutical drug and is supported on a keratin hydrolysis product, the keratin hydrolysis product undergoes a protease induced hydrolysis as a pseudo-peptide of the drug active peptide and the pharmaceutical drug is efficiently absorbed when it is administered through a mucous membrane (the rectum, nose, and lungs).

[0029]

This invention is explained in further detail below using examples, but the examples do not limit this invention.

[0030]

[Examples]

(Working Example)

The activated oxygen enzyme of a drug delivery system composed of a keratin hydrolysis product and super oxide damastase [transliteration] (SOD) was indicated to cause a variety of disorders associated mainly with ischemic tissue morbidity and inflammation. Super oxide damastase [transliteration] (SOD) recently attracted attention for its elimination of activated oxygen enzyme toxicity.

[0031]

The pharmaceutical application of SOD was actively studied. However, SOD administered into blood is quickly excreted in urine due to renal glomerulus filtration, and the problem was that it was not able to sufficiently achieve the enzyme activity.

[0032]

Therefore, a keratin hydrolysis product was chemically bonded to SOD as described below, and its movement *in vivo* was compared to that of unmodified SOD.

5 [0033]

A. Preparation of a Labeled Keratin Hydrolysis Product.

Hooves of water buffalo were hydrolyzed using Na_2S , and a keratin hydrolysis product having a molecular weight of about 4,000 was obtained using gel filtration. Na^{125}I was oxidized using lacto peroxidase as the catalyst, and a tyrosine hydrogen in the keratin hydrolysis product

10 mentioned above was substituted and labeled with ^{125}I .

[0034]

B. Bonding the Labeled Keratin Hydrolysis Product with SOD.

One gram of the keratin hydrolysis product was dissolved in 50 ml of 0.5M aqueous sodium bicarbonate solution, and succinic anhydride was added at ten-minute intervals five times in 100 mg portions. The mixture was agitated for 60 minutes at room temperature and left standing. During the reaction, pH was maintained at eight by adding 0.5M sodium bicarbonate. Upon completion of the reaction, the mixture was de-salinated and freeze dried to obtain succinylated keratin (80% yield).

20

[0035]

SOD and succinylated keratin, 50 mg and 150 mg, respectively, were dissolved in 0.1M phosphoric acid buffer solution (pH 6), and 100 mg of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodi-imide was added. The mixture was agitated for an hour at room temperature, additional sixteen hours at 4°C and left standing. Excess succinylated keratin was removed using ultra filtration method, and the bonded material fraction was collected using Sefacryl [transliteration] S-200 column in gel filtration. The fraction was freeze dried to obtain a SOD-keratin hydrolysis product bonded material (30% yield).

25

30 [0036]

C. Administration of Keratin Hydrolysis Product-SOD Complex.

Fifty milligrams of the keratin hydrolysis product-SOD complex obtained was dissolved in 10 ml of distilled water, and pH of the solution was adjusted to 7.4. Upon sterilizing, the solution was rapidly administered intravenously to mice (30 g-35 g) from the tail vein (150 μl /30 g).

[0037]

D. Time Dependent Concentration Change in Blood.

Radioactivity was measured using an autowell [transliteration] gamma counter to determine the concentration in blood, and the time dependent change was investigated.

[0038]

The results indicated that the keratin-SOD complex remained in plasma longer than unmodified SOD. As shown in Table 2, the half life in blood ($\alpha/2$) of the unmodified SOD was about seven minutes, but that of the keratin-SOD complex was about 50 minutes representing an extension of at least seven fold.

[0039]

[Table 2]

Pharmaceutical Drug Rate Theory Parameters

	$\alpha/2$ (min)
Unmodified SOD	7.1
Keratin hydrolysis product-SOD complex	51

[0040]

The results indicated that high SOD concentration in blood was maintained through SOD modification of keratin and its activity was also preserved. The keratin hydrolysis product-SOD complex of the working example performed better in the areas of *in vivo* compatibility or toxicity than the conventional SOD complexes of poly(ethylene glycol), albumin, and styrene maleic acid copolymer.

[0041]

(Reference Example)

The *in vivo* mobile keratin hydrolysis product after administering a keratin hydrolysis product using various administration methods was a keratin hydrolysis product obtained from water buffalo hooves upon hydrolysis using Na_2S and subsequent gel filtration. The molecular weight was about 4,000.

[0042]

The keratin hydrolysis product labeled using chloramine T method or lacto peroxidase method was dissolved in a phosphoric acid buffer having pH of 7.4. These products were subsequently administered using the methods described below. Radioactivity in the blood, urine or tissue was measured using an autowell [transliteration] gamma counter.

[0043]

1. Movement in vivo After Trans-pulmonary Administration.

Mice (30 g-35 g) under general anesthesia using pentobarbital were subjected to trans-pulmonary administration of 30 μ l of the labeled keratin hydrolysis product in phosphoric acid buffer solution (2 mg/ml).

[0044]

Concentration changes in blood are shown in Figure 1, a urine excretion curve is shown in Figure 2, and the time dependent concentration changes in liver and kidney are shown in Figure 3.

[0045]

2. Movement in vivo After Intravenous Administration.

A phosphoric acid buffer solution (400 μ g/ml) of the labeled keratin hydrolysis product was rapidly administered intravenously (150 μ l/30 g, 2 mg/kg) to mice (30g-35 g) using a tail vein.

[0046]

Concentration changes in blood are shown in Figure 4, a urine excretion curve is shown in Figure 5, and the time dependent concentration changes in liver and kidney are shown in Figure 6.

[0047]

3. Movement in vivo After Subcutaneous Administration.

A phosphoric acid buffer solution (400 μ g/ml) of the labeled keratin hydrolysis product was subcutaneously administered (150 μ l/30 g, 2 mg/kg) to mice (30g-35 g) on the back.

[0048]

Concentration changes in blood are shown in Figure 7, a urine excretion curve is shown in Figure 8, and the time dependent concentration changes in liver and kidney are shown in Figure 9.

[0049]

[Effect of the Invention]

An inexpensive carrier having low toxicity that can be prepared easily is used in the drug delivery system of this invention. A drug delivery system using this carrier can enable a pharmaceutical drug to accumulate in specific areas such as liver and kidney and to extend its residence time in blood.

[Simple Explanation of the Figures]

[Figure 1]

Concentration changes in blood of a keratin hydrolysis product upon trans-pulmonary administration are shown.

[Figure 2]

A urine excretion curve of a keratin hydrolysis product upon trans-pulmonary administration is shown.

[Figure 3]

The time dependent concentration changes of a keratin hydrolysis product in liver and kidney upon trans-pulmonary administration are shown.

[Figure 4]

Concentration changes in blood of a keratin hydrolysis product upon intravenous administration are shown.

[Figure 5]

A urine excretion curve of a keratin hydrolysis product upon intravenous administration is shown.

[Figure 6]

The time dependent concentration changes of a keratin hydrolysis product in liver and kidney upon intravenous administration are shown.

5 [Figure 7]

Concentration changes in blood of a keratin hydrolysis product upon subcutaneous administration are shown.

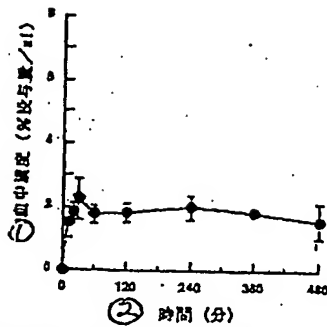
[Figure 8]

10 A urine excretion curve of a keratin hydrolysis product upon subcutaneous administration is shown.

[Figure 9]

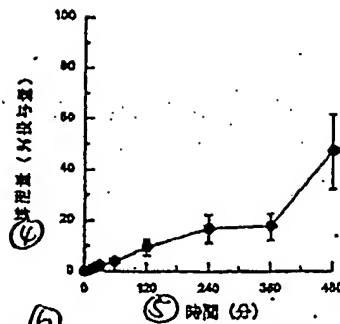
15 The time dependent concentration changes of a keratin hydrolysis product in liver and kidney upon subcutaneous administration are shown.

【図1】



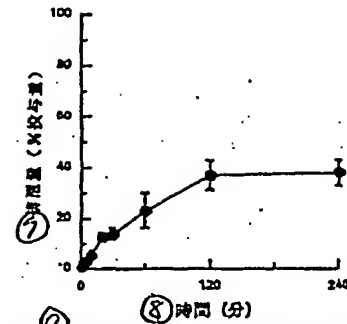
③ 経肺投与後のケラチン加水分解物の血中濃度推移

【図2】



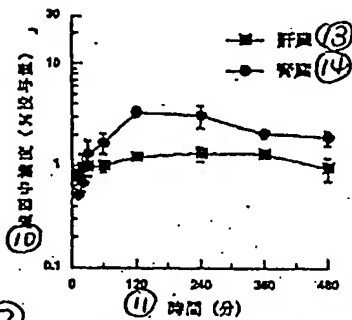
⑥ 経肺投与後のケラチン加水分解物の尿中排泄曲線

【図5】



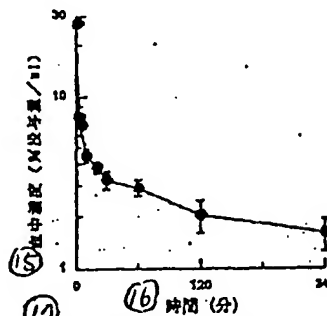
⑦ 静脈内投与後のケラチン加水分解物の尿中排泄曲線

【図3】



⑩ 経肺投与後のケラチン加水分解物の肝臓、腎臓での経時変化

【図4】

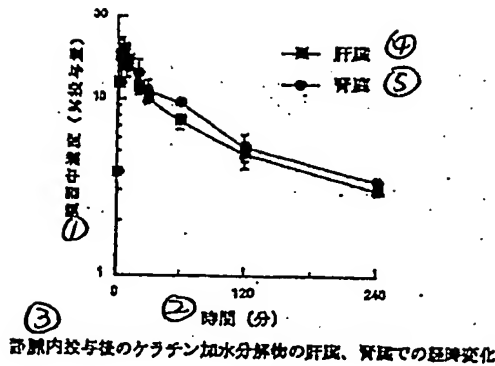


⑮ 静脈内投与後のケラチン加水分解物の血中濃度推移

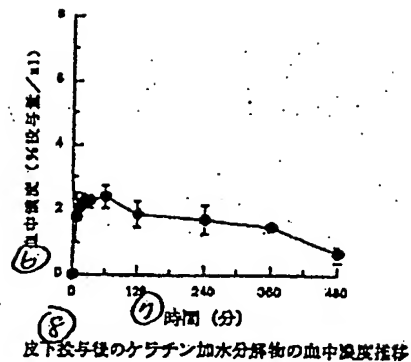
KEYS:

1. Concentration in blood (% amount administered/ml).
2. Time (minutes).
3. Concentration changes in blood of a keratin hydrolysis product upon trans-pulmonary administration.
4. Excretion rate (% amount administered).
5. Time (minutes).
6. A urine excretion curve of a keratin hydrolysis product upon trans-pulmonary administration.
7. Excretion rate (% amount administered).
8. Time (minutes).
9. A urine excretion curve of a keratin hydrolysis product upon intravenous administration.
10. Concentration in organs (% amount administered).
11. Time (minutes).
12. The time dependent concentration changes of a keratin hydrolysis product in liver and kidney upon trans-pulmonary administration.
13. Liver.
14. Kidney.
15. Concentration in blood (% amount administered/ml).
16. Time (minutes).
17. Concentration changes in blood of a keratin hydrolysis product upon intravenous administration.

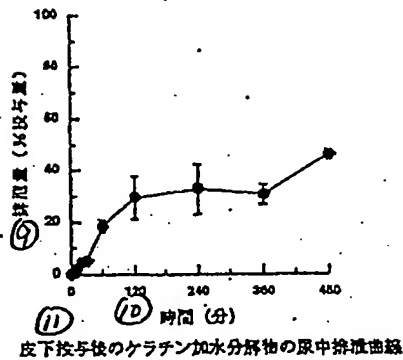
【図6】



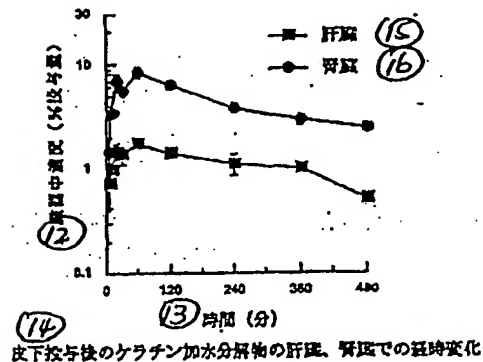
【図7】



【図8】



【図9】



1. Concentration in organs (% amount administered).
2. Time (minutes).
- 5 3. The time dependent concentration changes of a keratin hydrolysis product in liver and kidney upon intravenous administration.
4. Liver.
5. Kidney.
6. Concentration in blood (% amount administered/ml).
- 10 7. Time (minutes).
8. Concentration changes in blood of a keratin hydrolysis product upon subcutaneous administration.
9. Excretion rate (% amount administered).
10. Time (minutes).
- 15 11. A urine excretion curve of a keratin hydrolysis product upon subcutaneous administration is shown.
12. Concentration in organs (% amount administered).
13. Time (minutes).
- 20 14. The time dependent concentration changes of a keratin hydrolysis product in liver and kidney upon subcutaneous administration.
15. Liver.
16. Kidney.

Continued from the front page.

(72) Inventor: Yorikazu Sonoda

5 9-22 Ooe 1-chome, Kumamoto-shi, Kumamoto-ken

(72) Inventor: Hiroaki Egawa

875-106 Ooaza Ookubo, Shimizu-cho, Kumamoto-shi, Kumamoto-ken

10

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-293631

(43)公開日 平成6年(1994)10月21日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 9/00	F	7329-4C		
47/42	B	7433-4C		

審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全6頁)

(21)出願番号 特願平5-80939

(22)出願日 平成5年(1993)4月7日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年10月27日、
社団法人日本薬学会九州支部発行の「平成4年度日本薬
学会九州支部大会講演要旨集」に発表

(71)出願人 593068111

小田切 優樹

熊本県熊本市長嶺町1675番地32

(72)発明者 小田切 優樹

熊本県熊本市長嶺町1675番地32

(72)発明者 今井 輝子

熊本県熊本市花立2丁目24番26号

(72)発明者 西田 吉孝

奈良県生駒郡斑鳩興留9丁目5番7号

(72)発明者 木田 建次

熊本県熊本市帯山2丁目5番22号

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ケラチン加水分解物を担体として用いたドラッグデリバリーシステム

(57)【要約】

【目的】 ケラチン加水分解物を担体として用いた、安
価で毒性の低いドラッグデリバリーシステムを提供す
る。

【構成】 ケラチン加水分解物は、生体構成タンパク質
であるケラチンを加水分解して得られるペプチドであ
り、血中滞留性が高い。このケラチン加水分解物を担体
として薬物と結合させて投与する、本発明のドラッグデ
リバリーシステムを利用すると、薬物の至適有効量が長
時間にわたり持続される。ケラチン加水分解物は、投与
経路によって異なる体内動態を示し、特定の部位への集
積性がある。従って、ケラチン加水分解物を、その特定
の部位で薬効を発揮することが所望される薬物と結合さ
せて投与することにより、薬物に特定の部位への集積性
を付与し、薬効を増大させ得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】担体に薬物を担持させて投与するドラッグデリバリーシステムにおいて、該担体がケラチン加水分解物を含有する、ドラッグデリバリーシステム。

【請求項2】前記ケラチン加水分解物の分子量が3500から4500である、請求項1に記載のドラッグデリバリーシステム。

【請求項3】前記薬物に肝臓あるいは腎臓指向性を付与する、請求項1または2に記載のドラッグデリバリーシステム。

【請求項4】前記薬物がペプチド製剤である、請求項1または2に記載のドラッグデリバリーシステム。

【請求項5】前記薬物が抗炎症剤、抗がん剤、抗ウイルス剤からなる群から選択される、請求項1または2に記載のドラッグデリバリーシステム。

【請求項6】徐放性製剤である、請求項1から5のいずれかに記載のドラッグデリバリーシステム。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【産業上の利用分野】本発明は、担体としてケラチン加水分解物を用いるドラッグデリバリーシステムに関する。より詳しくは血中半減期が比較的長く、標的組織へ効果的に薬効成分を分布させることの可能な製剤を提供するためにケラチン加水分解物を担体として用いたドラッグデリバリーシステムに関する。

【0002】

【従来の技術】薬物は錠剤、注射剤など所定の剤形にして投与される。しかし、体内に入った薬物の全体が薬効に関わるのではない。そのごく一部が標的器官に到達して薬効を発揮し、残りは薬物を必要としない体内各部位に到達し、それが副作用の形で現れる。これまでの剤形は、便宜的に薬物のある作用点に送る手段として用いられてきた剤形であり、若干の無駄、不能率、弊害があってもやむを得ないとされてきた。ドラッグデリバリーシステムはこのような問題を解決するために生まれてきたものであり、薬物を他の組織に影響を与えずに作用部位あるいはその近くに到達させることを目的としたシステムである。このようなシステムによって、薬物の不必要な高い血中濃度の解消、至適量の体内持続時間の延長、副作用発現の抑制などが達成される。

【0003】ドラッグデリバリーシステムには、上記のように生体内の標的（特定の細胞、組織、器官など）に薬物を運んで選択的に吸着、集積、作用させるターゲティング機能に加えて、標的において該薬物が短時間のうちに放出されて代謝されることなく一定の濃度を維持することを可能にする放出抑制機能が必要である。

【0004】薬物をコントロールして放出するために有力な材料としては、エチレン-酢酸ビニル共重合体、ポリ乳酸、ポリエチレングリコール、スチレンマレイン酸共重合体などのような高分子膜が有用である。他にも生

体内で分解する徐放性のポリマーを用いたバイオ医薬の開発や、コラーゲンを用いた医薬品の徐放製剤化も研究されている。しかし、これらは生体適合性、毒性あるいは価格などの点で問題があった。

【0005】ドラッグデリバリーシステムのターゲット機能に関して言えば、最も直接的なターゲティングは、生体内の患部組織にドラッグデリバリーシステムを留置することであり、すでに婦人科、あるいは眼科での薬物に応用されている。例えば、婦人科では避妊の目的でプロゲステロンをT字形のバッグの中に入れ、それを子宮内に挿入するシステムが開発されている。眼科では、緑内障の患者にピロカルピンを中に封じ込んだ透明のコントロール膜をコンタクトレンズのように眼底部に装着させる薬剤が用いられている。

【0006】しかし生体内でのターゲティング機能を高めるための研究が望まれており、その成功のためには担体として何を用いるかが大きな問題となっている。特に、肝臓あるいは腎臓に特異的に取り込まれるような安価で毒性が少ない担体は発見されていない。従って肝臓あるいは腎臓で薬効が発揮されることが望まれる薬物と結合して、この薬物が、他の器官に副作用を与えることなく肝臓あるいは腎臓で有効濃度を持続させることを可能にする担体の開発が望まれている。さらに、一般に薬物がタンパク質製剤の場合は粘膜吸着性が悪く生体が異物として認識するために血中半減期が短い。そこでタンパク質製剤の血中滞留時間を延長する能力を持った担体の開発が望まれている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記問題を解決するものであり、その目的とするところは、毒性の低い安価なドラッグデリバリーシステム用の担体、特に薬物に肝臓あるいは腎臓などの特定の部位指向性、および血中滞留性を付与する担体を提供することであり、このような担体を用いたドラッグデリバリーシステムを確立することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、担体に薬物を担持させて投与するドラッグデリバリーシステムにおいて、その担体がケラチン加水分解物を含有するものであり、そのことにより上記目的が達成される。

【0009】好ましい実施態様においては、該ケラチン加水分解物の分子量は3500から4500である。

【0010】本発明の一つの実施態様においては、該ドラッグデリバリーシステムは、薬物に肝臓あるいは腎臓指向性を付与する。

【0011】本発明の一つの実施態様においては、本発明のドラッグデリバリーシステムに用いられる薬物はペプチド製剤である。

【0012】本発明の別の実施態様においては、本発明のドラッグデリバリーシステムに用いられる薬物が抗炎

症剤、抗がん剤、抗ウィルス剤からなる群から選択される。

【0013】本発明の別の実施態様においては、該ドラッグデリバリーシステムは徐放性製剤である。

【0014】本発明において「担体」とは、薬物と共に混合分散され、吸着、化学結合などの手法により薬物と結合し、複合体を形成する物質のことである。

【0015】「徐放性製剤」とは、上記の薬物-担体複合体が、生体に投与された時に、所定の期間にわたって望ましい速度で薬物が担体から徐々に放出（脱離）されるような製剤である。

【0016】「ケラチン」とは、動物の皮膚の上皮由来で、体の一番外側にある構造体の主成分タンパク質であり、そしてジスルフィド結合に富む不溶性の細胞内タンパク質である。

【0017】「ケラチン加水分解物」とは、上記ケラチンを加水分解して得られる物質であり、水溶性の物質である。

【0018】ケラチン原料はウシの蹄角、羊毛、羽毛、髪、爪などから大量に安価に得ることが可能である。加水分解の方法としては、 Na_2S による加水分解、酵素による加水分解、酸による加水分解、アルカリによる加水分解などの方法が挙げられ、好ましくは Na_2S による加水分解である。ケラチン加水分解物は原料から1段階の加水分解を行うだけで容易に調製され得る。種々の分子量のケラチン加水分解物を含むケラチン加水分解液からの、所望の分子量を有するケラチン加水分解物の単離はゲル濾過、透析膜分離などによって行う。

【0019】本発明のケラチンを担体として用いたドラッグデリバリーシステムにおいては、薬物-ケラチン加水分解物複合体は、化学結合、物理的吸着、イオン結合などの当業者に公知の方法で、薬物とケラチン加水分解

物とを結合させることによって得られる。好適な実施態様においては、薬物をケラチン加水分解物を含む水溶液に溶解し化学処理することによって化学的に結合させる。

【0020】上記の薬物-ケラチン加水分解物複合体におけるケラチンと薬物との量的な関係は、ケラチン加水分解物100量部に対して、薬物20部～100部であり、好ましくは40部～50部である。液剤として用いる場合のケラチン加水分解物の濃度は、0.1～10重量%であり、好ましくは0.5～1.0重量%である。

【0021】上記の薬物-ケラチン複合体は生理食塩水、生理的緩衝液、注射用蒸留水、好ましくは注射用蒸留水に溶解後、pHを7.0～7.4に調整し、さらに滅菌を行って注射用の製剤とし、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与に供される。あるいはカプセル剤、錠剤、液剤として、経粘膜投与することも可能である。

【0022】本発明のドラッグデリバリーシステムの高い血中滞留性は、担体として用いるケラチン加水分解物によって達成される。

【0023】体内に投与されたケラチン加水分解物は、生体内のプロテアーゼによって加水分解を受け尿中に排泄されるが、その排泄速度は他のタンパク質に比べて非常に遅く、血中における滞留性が高い。表1に水牛の蹄角を Na_2S によって加水分解して得た分子量約4000のケラチン加水分解物（ケラチン4000と称する）の所定の濃度の溶液と、マウス血漿またはヒト血清アルブミン（HSA）とを接触させたときの結合率を示す。このようにケラチン加水分解物は血漿成分と強く結合するため、上記のように血中滞留性が良好であると考えられる。

【0024】

【表1】

ケラチン加水分解物と、マウス血漿またはウシ血清アルブミン（HSA）との結合率（単位%）

ケラチン4000	マウス血漿	4% HSA
0.0004%	85.5 ± 0.6	69.5 ± 1.8
0.0012%	91.5 ± 1.9	71.8 ± 3.2
0.002%	92.2 ± 4.5	72.5 ± 2.2

【0025】従って、実施例に示すように、スーパーオキシドディムスターゼ(SOD)などの消失半減期の短いタンパク質製剤薬物に結合させることによって、薬物-ケラチン複合体の血中滞留性を増大し、薬効を増大することが可能である。ケラチン加水分解物の分子量と各臓器からの消失速度定数との間には相関関係があり、ケラチン加水分解物の分子量により臓器からの消失を調節する

ことが可能であると考えられる。

【0026】さらに別の見地では、一般に高分子化合物の血中滞留性が増大すると、炎症部位などの血管透過性が増大した組織へ移行しやすくなることが知られている。このことによりケラチン加水分解物を担体として用いて、抗炎症剤、抗がん剤、抗ウィルス剤などの薬剤と結合させて静脈内、筋肉内あるいは皮下投与することに

より、薬物が薬効を発揮することが所望される炎症部位へ効率よく運ぶことが可能である。

【0027】ケラチン加水分解物は、静脈内投与されると、肝臓および腎臓に分布する割合が高く、血中から消失していくケラチンは特異的に肝臓および腎臓に集積する。このことにより、肝臓あるいは腎臓での薬効を発揮することが望まれる薬物に肝臓あるいは腎臓指向性を付与することが可能である。

【0028】さらに薬物がペプチドであり、プロテアーゼによる加水分解のために分解され薬効を消失するような場合にも、ケラチン加水分解物にこの薬物であるペプチドを担持させて各粘膜（直腸、鼻、肺など）から投与すると、ケラチン加水分解物が、薬効ペプチドの疑似ペプチドとしてプロテアーゼによる加水分解を受け、薬物が効率よく吸収されるという利点がある。

【0029】以下に実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明を限定するものではない。

【0030】

【実施例】

（実施例）ケラチン加水分解物とスーパーオキシドディムスターゼ(SOD)を用いたドラッグデリバリーシステム
活性酸素酵素は、虚血性組織病変や炎症を主体とする各種の疾患を引き起こすことが示唆されている。スーパーオキシドディムスターゼ(SOD)は、この活性酸素酵素毒性を消去することで最近注目されている酵素である。

【0031】SODの医薬への応用に関する研究は活発になされてきたが、血中に投与されたSODは、腎糸球体濾過により速やかに尿中に排泄されてしまい、体内ではその酵素活性を十分に発現できないことが問題であった。

【0032】そこで以下に記載のように、ケラチン加水分解物をSODに化学結合させ、その体内動態を調べ未修飾SODの体内動態と比較した。

【0033】A. 標識ケラチン加水分解物の調製
水牛の蹄角をNa₂Sで加水分解後、ゲル濾過によって分子

量約4000のケラチン加水分解物を得る。触媒としてラクトパーオキシダーゼを用いてNa¹²⁵Iを酸化し、遊離した¹²⁵Iで上記のケラチン加水分解物のチロシンの水素を置換して、標識した。

【0034】B. 標識ケラチン加水分解物とSODとの結合
ケラチン加水分解物1gを0.5M炭酸水素ナトリウム水溶液50mlに溶解し、無水コハク酸を10分ごとに100mgずつ5回添加した。これを室温で60分間攪拌放置する。なお反応中は、0.5M炭酸水素ナトリウムを加えることによりpHを8に保つ。反応終了後、脱塩化し凍結乾燥してサクシニル化ケラチンを得た(収率80%)。

【0035】SOD50mg、サクシニル化ケラチン150mgを0.1Mのリン酸緩衝液(pH6)に溶解し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド100mgを加えた。これを室温で1時間、さらに4℃で16時間攪拌放置した。限外濾過法により過剰のサクシニル化ケラチンを除去した後、セファクリルS-200カラムによりゲル濾過して結合体の分画を集め、凍結乾燥してSOD-ケラチン加水分解物結合体を得た(収率30%)。

【0036】C. ケラチン加水分解物-SOD複合体の投与
得られたケラチン加水分解物-SOD複合体50mgを注射用蒸留水10mlに溶解し、pHを7.4に調整し滅菌した後、マウス(30g-35g)の尾静脈より急速静脈内投与した(150μl/30g)。

【0037】D. 血中濃度の経時変化
オートウェルガンマカウンタで放射活性を測定することによって血中内濃度を測定し、経時変化を調べた。

【0038】その結果、未修飾SODよりもケラチン-SOD複合体の方がより長く血漿中に滞留しており、表2に示すように、未修飾SODの血中半減期($\alpha/2$)が約7分であるのに対してケラチン-SOD複合体の血中半減期は約50分と7倍以上延長された。

【0039】

【表2】

薬物速度論パラメータ

	$\alpha_{1/2}(\text{min})$
未修飾SOD	7.1
ケラチン加水分解物-SOD複合体	51

【0040】このことは、ケラチンでSODを修飾することによりSODの血中濃度が高く保たれ、またその活性も維持されていることを示唆している。本実施例のケラチン加水分解物-SOD複合体は、生体適合性あるいは毒性などの面から、従来のポリエチレングリコール、アルブミン、スチレンマレイン酸共重合体とSODとの複合体より優れていた。

【0041】（参考例）ケラチン加水分解物の種々の投与方法による投与後の体内動態ケラチン加水分解物は、

水牛の蹄角をNa₂Sによって加水分解した後ゲル濾過して得られた、分子量約4000のものを使用した。

【0042】クロラミンT法、あるいはラクトパーオキシダーゼ法によって標識したケラチン加水分解物をpH7.4のリン酸バッファーに溶解して、次に示す各投与方法で投与した。測定は血液、尿あるいは組織をオートウェルガンマカウンタで放射活性を測定することによって行った。

【0043】1. 経肺投与後の体内動態

ペントバルビタール完全麻酔下のマウス (30g-35g) に標識したケラチン加水分解物のリン酸バッファー溶液 (2mg/ml) 30 μ l を経肺投与した。

【0044】図1に血中濃度推移、図2に尿中排泄曲線、図3に肝臓および腎臓内濃度の経時変化を示す。

【0045】2. 静脈内投与後の体内動態
標識したケラチン加水分解物のリン酸バッファー溶液 (400 μ g/ml) を150 μ l/30g (2mg/kg) マウス (30g-35g) の尾静脈に急速静脈内投与した。

【0046】図4に血中濃度推移、図5に尿中排泄曲線、図6に肝臓および腎臓内濃度の経時変化を示す。

【0047】3. 皮下投与後の体内動態
標識したケラチン加水分解物のリン酸バッファー溶液 (400 μ g/ml) を150 μ l/30g (2mg/kg) マウス (30g-35g) 背部皮下に投与した。

【0048】図7に血中濃度推移、図8に尿中排泄曲線、図9に肝臓および腎臓内濃度の経時変化を示す。

・【0049】

【発明の効果】本発明のドラッグデリバリーシステムにおいては、安価で毒性が低く、調製が容易な担体が用いられる。この担体を用いたドラッグデリバリーシステム

により、薬物に、肝臓あるいは腎臓などの特定の部位集積性および血中滞留性を付与することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】経肺投与後のケラチン加水分解物の血中濃度推移を示す。

【図2】経肺投与後のケラチン加水分解物の尿中排泄曲線を示す。

【図3】経肺投与後のケラチン加水分解物の肝臓および腎臓での経時変化を示す。

【図4】静脈内投与後のケラチン加水分解物の血中濃度推移を示す。

【図5】静脈内投与後のケラチン加水分解物の尿中排泄曲線を示す。

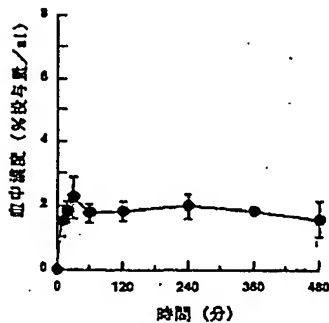
【図6】静脈内投与後のケラチン加水分解物の肝臓および腎臓での経時変化を示す。

【図7】皮下投与後のケラチン加水分解物の血中濃度推移を示す。

【図8】皮下投与後のケラチン加水分解物の尿中排泄曲線を示す。

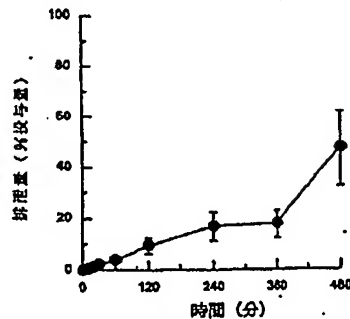
【図9】皮下投与後のケラチン加水分解物の肝臓および腎臓での経時変化を示す。

【図1】



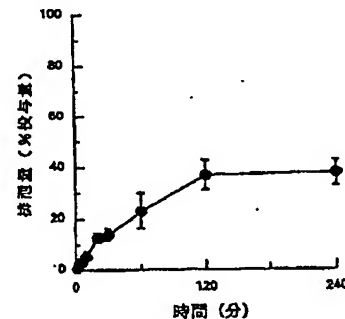
経肺投与後のケラチン加水分解物の血中濃度推移

【図2】



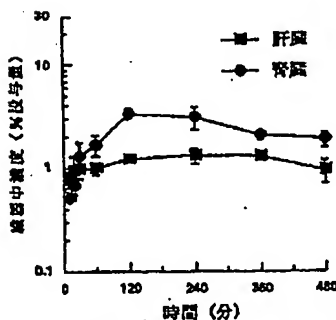
経肺投与後のケラチン加水分解物の尿中排泄曲線

【図5】



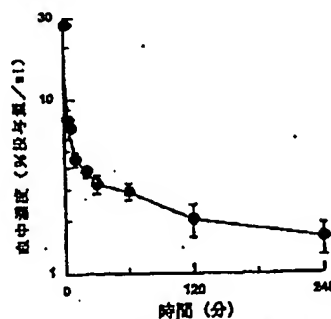
静脈内投与後のケラチン加水分解物の尿中排泄曲線

【図3】



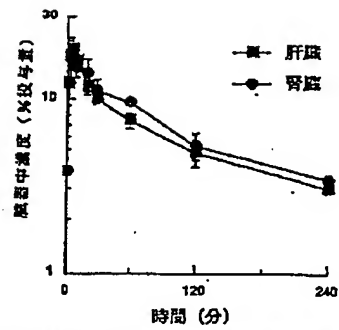
経肺投与後のケラチン加水分解物の肝臓、腎臓での経時変化

【図4】



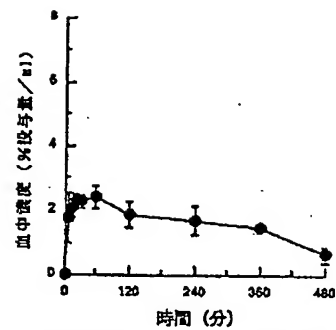
静脈内投与後のケラチン加水分解物の血中濃度推移

【図6】



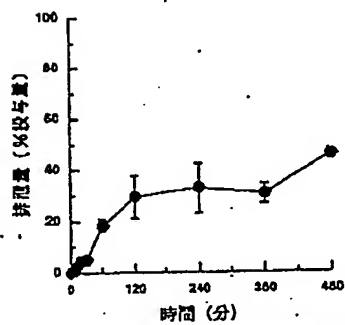
静脈内投与後のケラチン加水分解物の肝臓、腎臓での経時変化

【図7】



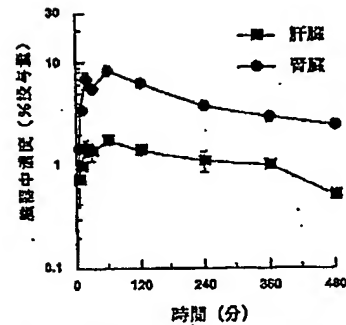
皮下投与後のケラチン加水分解物の血中濃度推移

【図8】



皮下投与後のケラチン加水分解物の尿中排泄曲線

【図9】



皮下投与後のケラチン加水分解物の肝臓、腎臓での経時変化

フロントページの続き

(72)発明者 園田 頼和
熊本県熊本市大江1丁目9番22号

(72)発明者 江川 博明
熊本県熊本市清水町大字大窪875番地106